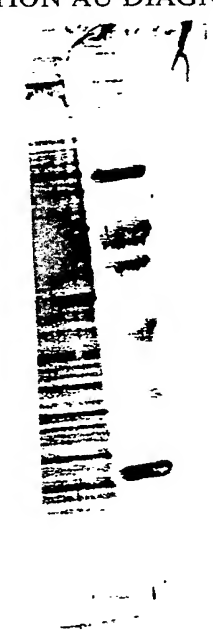




DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

<b>(51) Classification internationale des brevets<sup>4</sup> :</b> <b>C12P 21/00, G01N 33/569</b> <b>// (C12P 21:00, C12R 1:90)</b>	<b>A1</b>	<b>(11) Numéro de publication internationale: WO 89/ 01045</b> <b>(43) Date de publication internationale: 9 février 1989 (09.02.89)</b>											
<p><b>(21) Numéro de la demande internationale:</b> PCT/FR88/00400</p> <p><b>(22) Date de dépôt international:</b> 2 août 1988 (02.08.88)</p> <p><b>(31) Numéro de la demande prioritaire:</b> 87/10979</p> <p><b>(32) Date de priorité:</b> 3 août 1987 (03.08.87)</p> <p><b>(33) Pays de priorité:</b> FR</p> <p><b>(71) Déposants (pour tous les Etats désignés sauf US):</b> INSTITUT PASTEUR [FR/FR]; 28, rue du Docteur-Roux, F-75724 Paris Cédex 15 (FR). UNIVERSITE DE COMPIEGNE (I.T.S.) [FR/FR]; Rue Roger-Couttolène, F-60206 Compiègne (FR). VIRBAC S.A. [FR/FR]; 1ère avenue 1065 M, L.I.D., F-06516 Carros Cédex (FR).</p> <p><b>(72) Inventeurs; et</b>  <b>(75) Inventeurs/Déposants (US seulement) :</b> BERNEMAN, Armand [FR/FR]; 1, rue Crussol, F-75011 Paris (FR). ROLLAND, Xavier [FR/FR]; 21, rue des Someliers, F-60200 Compiègne (FR).</p>		<p><b>(74) Mandataires:</b> BRYCMAN, Jean etc.; Cabinet Orès, 6, avenue de Messine, F-75008 Paris (FR).</p> <p><b>(81) Etats désignés:</b> AT (brevet européen), BE (brevet européen), BJ (brevet OAPI), CF (brevet OAPI), CG (brevet OAPI), CH (brevet européen), CM (brevet OAPI), DE (brevet européen), FR (brevet européen), GA (brevet OAPI), GB (brevet européen), IT (brevet européen), JP, LU (brevet européen), ML (brevet OAPI), MR (brevet OAPI), NL (brevet européen), SE (brevet européen), SN (brevet OAPI), TD (brevet OAPI), TG (brevet OAPI), US.</p> <p><b>Publiée</b>  <i>Avec rapport de recherche internationale.</i>  <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i></p>											
<p><b>(54) Title:</b> LEISHMANIA-SPECIFIC ANTIGENS, PROCESS FOR PREPARING THEM, ANTIGENIC PROFILES CONTAINING THESE ANTIGENS AND THEIR APPLICATION TO THE DIAGNOSIS OF VISCERAL LEISHMANIASIS</p> <p><b>(54) Titre:</b> ANTIGENES SPECIFIQUES DE LEISHMANIA ET LEUR PROCÉDE DE PREPARATION, PROFILS ANTIGENIQUES CONTENANT CES ANTIGENES ET LEUR APPLICATION AU DIAGNOSTIC DES LEISHMANIOSES VISCÉRALES</p> <p><b>(57) Abstract</b></p> <p>The invention concerns leishmania-specific antigens, the process for preparing them, and antigenic profiles containing these antigens. Said antigens are recognized in a specific manner by the sera of persons or animals, especially dogs, suffering from visceral leishmaniasis, which do not exhibit cross-reactions with the sera of patients suffering from other diseases. Applications to the diagnosis of visceral leishmaniasis.</p> <p><b>(57) Abrégé</b></p> <p>La présente invention est relative à des antigènes spécifiques de Leishmania, à leur procédé de préparation et à des profils antigéniques contenant ces antigènes. Lesdits antigènes sont reconnus de manière spécifique par des sérums de malades d'origine humaine ou animale, notamment canine, atteints de leishmaniose viscérale et ne présentant pas de réactions croisées avec des sérums de malades atteints d'autres affections. Application au diagnostic de la leishmaniose viscérale.</p> <div data-bbox="1218 1218 1542 1848" style="float: right; text-align: right;">  <table border="0"> <tr><td>330</td></tr> <tr><td>220</td></tr> <tr><td>94</td></tr> <tr><td>67</td></tr> <tr><td>60</td></tr> <tr><td>43</td></tr> <tr><td>36</td></tr> <tr><td>30</td></tr> <tr><td>20,5</td></tr> <tr><td>18,5</td></tr> <tr><td>14,4</td></tr> </table> </div> <div data-bbox="1282 1911 1412 1995" style="text-align: right; margin-top: 20px;">       LEM 497        Serum H     </div>			330	220	94	67	60	43	36	30	20,5	18,5	14,4
330													
220													
94													
67													
60													
43													
36													
30													
20,5													
18,5													
14,4													

**UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	FR	France	ML	Mali
AU	Australie	GA	Gabon	MR	Mauritanie
BB	Barbade	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
BE	Belgique	HU	Hongrie	NL	Pays-Bas
BG	Bulgarie	IT	Italie	NO	Norvège
BJ	Bénin	JP	Japon	RO	Roumanie
BR	Brésil	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CF	République Centrafricaine	KR	République de Corée	SE	Suède
CG	Congo	LI	Liechtenstein	SN	Sénégal
CH	Suisse	LK	Sri Lanka	SU	Union soviétique
CM	Cameroun	LU	Luxembourg	TD	Tchad
DE	Allemagne, République fédérale d'	MC	Monaco	TG	Togo
DK	Danemark	MG	Madagascar	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande				

ANTIGENES SPECIFIQUES DE LEISHMANIA ET LEUR PROCEDE DE PREPARATION, PROFILS ANTIGENIQUES CONTENANT CES ANTIGENES ET LEUR APPLICATION AU DIAGNOSTIC DES LEISHMANIOSES VISCERALES.

La présente invention est relative à des antigènes spécifiques de Leishmania et à leur procédé de préparation, à des profils antigéniques contenant ces antigènes et à leur application au diagnostic des leishmanioses viscérales.

5 Les leishmanioses sont des maladies endémiques provoquées par un protozoaire monoflagellé du genre Leishmania. Le cycle des Leishmania se répartit entre une forme non mobile, présente chez les macrophages de l'hôte vertébré, et une forme mobile chez un insecte vecteur, le phlébotome. Chaque  
10 espèce de Leishmania provoque un type de maladie aux symptômes bien définis : cutanés, cutanéomuqueux ou viscéraux. Ces maladies, outre le fait qu'elles soient largement répandues dans le monde, sont difficilement identifiables et guérissables.

15 Les leishmanioses peuvent être diagnostiquées au laboratoire, chez l'homme ou chez le chien par exemple, soit par isolement et identification du parasite, soit pour certaines leishmanioses, par la détection d'anticorps spécifiques dans le sérum.

20 Toutefois, les cultures qu'il est nécessaire de réaliser pour isoler et identifier le parasite sont longues et fastidieuses à mettre en oeuvre ; de plus, cette identification peut, surtout, s'avérer dangereuse dans le cas d'un syndrome viscéral (ponctions de moëlle osseuse, ponctions splé-  
25 niques).

Au contraire, les tests de diagnostic immunologique qui détectent les anticorps spécifiques constituent des réactions de dépistage propres à affirmer ou confirmer de façon suffisamment précoce le diagnostic d'une leishmaniose, notam-  
30 ment viscérale.

Cependant, les tests de diagnostic immunologiques ne peuvent être réalisés que dans le cas des leishmanioses productrices d'anticorps spécifiques, notamment les leishmanioses viscérales, et non dans le cas par exemple des leishma-  
35 nioses cutanées de "l'Ancien Monde", ces dernières ne donnant

- 2 -

pas lieu à la formation d'anticorps spécifiques.

Les premiers tests de détection des anticorps, en ce qui concerne les leishmanioses viscérales, ont été la réaction d'immunofluorescence et l'électrosynérèse ; cependant, ces tests présentent l'inconvénient d'être des méthodes lourdes à mettre en oeuvre.

PAPPAS et Al. ont proposé un test de type ELISA qui se révèle plus rapide et plus sensible que lesdits premiers tests ; cependant, le test de type ELISA, pour le diagnostic de la leishmaniose viscérale, décrit par PAPPAS et Al., manque de spécificité et 20 % de taux positifs sont obtenus avec des malades ayant une trypanosomiase et également avec des sujets sains vivant en Afrique.

D'autres réactions croisées avec les leishmanioses ont été décrites, notamment avec les sérums de malades atteints de lèpre, de tuberculose et de paludisme.

Bien que la mise en oeuvre du test ELISA constitue un progrès important par rapport aux méthodes précédemment préconisées, son manque de spécificité ne permet pas de l'envisager comme un test de référence, dans le cas de la leishmaniose.

En effet, lorsqu'on utilise le test ELISA, comme test de diagnostic des leishmanioses, on observe un bruit de fond trop important, qui ne permet pas d'évaluer les résultats obtenus.

La présente invention s'est, en conséquence, donné pour but de pourvoir à des antigènes spécifiques des Leishmania qui provoquent la leishmaniose viscérale chez les mammifères, notamment chez l'homme et chez le chien, qui donnent une réponse en anticorps avec une sûreté de diagnostic de l'ordre de 100 %, lorsqu'ils sont utilisés pour le diagnostic de la leishmaniose viscérale, sous forme de profils électrophorétiques transférés sur des bandelettes, dans le cadre de la technique d'analyse par immunoempreinte et/ou lorsqu'ils sont utilisés sous forme isolée dans le cadre d'un test ELISA ou d'un test RIA.

- 3 -

La présente invention a pour objet des antigènes spécifiques de *Leishmania*, parasite qui provoque la leishmaniose viscérale chez les mammifères, notamment chez l'homme et/ou chez le chien, caractérisés en ce qu'ils sont reconnus de manière spécifique par des sérums de malades d'origine humaine ou animale, notamment canine, atteints de leishmaniose viscérale et en ce qu'ils ne présentent pas de réactions croisées avec des sérums de malades atteints d'autres affections.

10 Selon une disposition avantageuse de ce mode de réalisation, les antigènes spécifiques sont des antigènes de *Leishmania infantum*.

Selon une autre disposition avantageuse de ce mode de réalisation, les antigènes spécifiques sont des antigènes de *Leishmania donovani*.

20 Selon une disposition avantageuse de ce mode de réalisation, les antigènes spécifiques de *Leishmania infantum* sont caractérisés en ce qu'ils ont respectivement une masse moléculaire de 150 KD, une masse moléculaire de 94 KD, une masse moléculaire de 75 KD, une masse moléculaire de 30 KD, une masse moléculaire de 33 KD et une masse moléculaire de 20 KD.

25 Les poids moléculaires ont été calculés en comparant la vitesse de migration électrophorétique desdits antigènes à celui de marqueurs de poids moléculaire appropriés, tels que ceux fournis par Pharmacia.

30 Selon une modalité avantageuse de cette disposition, les antigènes spécifiques de *Leishmania infantum* de masse moléculaire 150 KD, 94 KD et 75 KD sont reconnus par des IgG de sérums de malades d'origine humaine.

Selon une autre modalité avantageuse de cette disposition, les antigènes spécifiques de *Leishmania infantum* de masse moléculaire 75 KD, 33 KD et 20 KD sont reconnus par des IgG de sérums de malades d'origine canine.

35 Selon encore une autre modalité avantageuse de cette

- 4 -

disposition, les antigènes spécifiques de Leishmania de masse moléculaire 30 KD sont reconnus par des IgE de sérums de malades d'origine humaine.

L'antigène 150 KD a un point isoélectrique (pI) de 6,5.

L'antigène 94 KD a un pI de 7,6.

L'antigène 75 KD est un mélange de molécules dont les pI sont respectivement de 7,6 ; 7,5 ; 6,9 ; 5,3 ; 4,85.

L'antigène 33 KD est un mélange de deux molécules de pI 5,30 et 5,00.

L'antigène 20 KD est un mélange de deux molécules de pI 7,6 et 6,5.

La détermination des points isoélectriques se fait par isoélectrofocalisation en agarose, suivie d'une électrophorèse en PAGE-SDS. Le profil obtenu est transféré sur nitrocellulose puis soumis à une immunoempreinte avec un sérum de malade (homme ou chien).

Selon un autre mode de réalisation, chacun desdits antigènes est à l'état pur et se trouve sous forme liquide ou lyophilisée.

Selon une disposition avantageuse de ce mode de réalisation, les antigènes sont adsorbés sur des supports solides.

La présente invention a également pour objet un agent de diagnostic de la leishmaniose viscérale chez l'homme et chez l'animal, notamment le chien, lequel agent de diagnostic est caractérisé en ce qu'il est constitué par un profil électrophorétique, de préférence mis sous forme de bandelette, qui contient les antigènes définis précédemment.

La présente invention a également pour objet un procédé de préparation des antigènes spécifiques des Leishmania qui provoquent la leishmaniose viscérale chez les mammifères.

Selon un mode de mise en oeuvre avantageux, le procédé consiste à :

- 5 -

- cultiver des souches de *Leishmania* provoquant la leishmaniose viscérale chez les mammifères, à une température et pendant une durée appropriée, dans un milieu approprié ;
- séparer les antigènes obtenus, après centrifugation desdites cultures, dans le culot de centrifugation remis en suspension dans un tampon approprié, en réalisant une électrophorèse appropriée.

Selon un autre mode de mise en oeuvre avantageux du procédé conforme à l'invention, les antigènes séparés par électrophorèse, comme décrit ci-dessus, sont transférés, par transfert ou électrotransfert sur des bandelettes en matériau approprié tel que nitrocellulose ou polyamide (nylon) notamment, pour former des profils antigéniques dont une partie est éventuellement avantageusement colorée à l'aide d'un colorant approprié tel que de l'encre de Chine notamment, les profils antigéniques obtenus portés par lesdites bandelettes étant avantageusement conservés à sec.

Selon un mode de mise en oeuvre avantageux du procédé de préparation conforme à la présente invention, on cultive des souches de *Leishmania infantum* dans un milieu approprié pendant environ 3 jours et à une température de 28°C, pour obtenir un volume contenant  $4.10^7$  *Leishmania*/ml.

Selon une modalité avantageuse de l'invention, la souche de *Leishmania infantum* utilisée est une souche LEM497 (MCAN/GR/82).

Selon une autre modalité avantageuse de cette disposition, la souche de *Leishmania infantum* utilisée est une souche LGR4 (HOM/GR/78/LGR4).

Selon une autre modalité avantageuse de l'invention, le milieu de culture est un milieu RPMI/199 (1:1) à 10 % de SVF.

Selon encore une autre modalité avantageuse de l'invention, l'électrophorèse est réalisée selon la technique de LAEMMLI avec des gels de polyacrylamide de concentration appropriée, sur lesquels sont déposées  $6.10^8$  *Leishmania* obte-

- 6 -

nues à partir du culot de centrifugation de culture remis en suspension dans un tampon approprié.

Selon une autre modalité avantageuse de l'invention, le transfert ou l'électrotransfert des antigènes séparés par électrophorèse est réalisé à température ambiante sur nitro-cellulose ou polyamide (nylon), de préférence selon la méthode de TOWBIN, pour former les profils antigéniques desdites souches.

Selon une autre modalité avantageuse de l'invention, les profils électrophorétiques antigéniques transférés non colorés constituent l'un des réactifs d'un coffret de diagnostic et les profils électrophorétiques transférés colorés, notamment à l'encre de Chine, constituent le profil antigénique total de Leishmania, les profils électrophorétiques tant colorés que non colorés étant découpés en bandelettes.

Conformément à l'invention, une bandelette non colorée subit une incubation d'une part avec un sérum de malade ou de chien malade, puis d'autre part, le complexe antigène-anticorps est révélé par un conjugué enzymatique anti-homme ou anti-chien selon le cas, et enfin, on visualise sur la bandelette l'activité enzymatique ; ceci permet de détecter sélectivement les antigènes spécifiques de la leishmaniose viscérale humaine ou animale sur un support adéquat.

Conformément à l'invention, une bandelette colorée permet de révéler la plupart des antigènes présents, qui sont identifiés à l'aide de marqueurs de masse moléculaire.

Le Rf de chaque bande antigénique ayant migré est défini par la distance de migration d'un antigène à partir de l'origine sur la distance d'un témoin de migration à partir de l'origine, qui est visualisé par un colorant tel que le bleu de bromophénol.

En variante à ce mode de mise en oeuvre, on cultive des souches de Leishmania donovani.

Selon un autre mode de mise en oeuvre du procédé de préparation des antigènes, le procédé consiste à :

- cultiver des souches de Leishmania qui provoquent la leish-



- 7 -

- maniose viscérale chez les mammifères, à une température et pendant une durée appropriées, dans un milieu approprié ;
- séparer les antigènes obtenus, après centrifugation desdites cultures, dans le culot de centrifugation remis en suspension dans un tampon approprié, en réalisant une électrophorèse appropriée ;
  - injecter les antigènes ainsi séparés à un animal, notamment un lapin, pour provoquer la production chez ce dernier d'anticorps spécifiques contre lesdits antigènes,
  - 10 - séparer les anticorps produits par l'animal immunisé, notamment le lapin, du sérum prélevé chez ce dernier, par chromatographie d'affinité ;
  - isoler les antigènes retenus sur la colonne d'affinité et les recueillir ensemble ou séparément sous forme liquide ou
  - 15 lyophilisée.

Lesdits antigènes sont alors utilisables conjointement ou séparément, lesdits antigènes étant éventuellement adsorbés sur un support solide approprié.

- Selon une disposition avantageuse de ce mode de mise
- 20 en oeuvre, on cultive des souches de *Leishmania infantum* dans un milieu RPMI/199 (1:1) à 10 % de SVF pendant environ 3 jours à une température de 28°C de manière à obtenir un volume contenant de  $4.10^7$  *Leishmania*/ml.

- Selon une autre disposition avantageuse de ce mode
- 25 de mise en oeuvre, l'électrophorèse est réalisée sur des gels de polyacrylamide de concentration appropriée et sur lesquels sont déposés de  $12.10^8$  à  $18.10^8$  *Leishmania* dans ledit gel.

- Selon une autre disposition avantageuse de ce mode de mise en oeuvre, une partie dudit gel est colorée au moyen
- 30 d'un colorant, ladite coloration permettant de déterminer la migration des antigènes spécifiques de *Leishmania* dans ledit gel.

- Selon une autre disposition avantageuse de ce mode de réalisation, une autre partie dudit gel est découpée en
- 35 rapport avec lesdits antigènes spécifiques de *Leishmania*, mise sous une forme injectable et injectée à un animal, notam-

- 8 -

ment un lapin, pour produire chez ce dernier des anticorps qui sont isolés du sérum prélevé chez ledit animal, lesdits anticorps étant purifiés sur une colonne de chromatographie appropriée, puis couplés à du Sépharose à l'aide d'un agent  
5 de couplage approprié (bromure de cyanogène notamment), pour former un gel d'affinité.

La purification peut être réalisée soit sur une colonne de protéine A-Sépharose (Pharmacia), soit sur une colonne d'échangeurs d'ions (DEAE-Cellulose Pharmacia). Le cou-  
10 plage est réalisé soit à du Sépharose Cl6D, soit à du Sépharose Cl4B Pharmacia.

Selon encore une autre disposition, on forme avec lesdits anticorps couplés une colonne d'affinité dans laquelle est passé un lysat de Leishmanies resuspendu dans un tam-  
15 pon approprié.

Selon une autre disposition les antigènes retenus sur la colonne sont recueillis en présence d'une haute force ionique et constituent les antigènes spécifiques purs de Leishmania conforme à l'invention.

20 Il s'est avéré que les antigènes spécifiques de Leishmania conformes à la présente invention présentent une très grande sensibilité et que leur application, soit sous forme de profils antigéniques dans le cadre de la technique d'analyse par immunoempreinte, soit dans un test ELISA, soit  
25 dans un test RIA, permet d'obtenir une sûreté de diagnostic de 100 %.

En particulier, chez l'homme, la reconnaissance des antigènes 150 KD, 94 KD et 75 KD, simultanément ou pas, permet l'obtention d'un diagnostic sûr, hautement spécifique.

30 De même, chez le chien, la reconnaissance des antigènes 75 KD, 33 KD et 20 KD, soit séparément, soit par paires, soit simultanément, permet l'obtention d'un diagnostic sûr, hautement spécifique.

Les antigènes spécifiques de Leishmania conformes à  
35 la présente invention permettent de détecter dans les sérums

- 9 -

de patients, la présence d'IgG anti-Leishmania spécifiques.

La présente invention a en conséquence également pour objet un procédé de diagnostic de leishmaniose viscérale qui consiste à détecter les anticorps antileishmania présents dans un sérum à contrôler, à l'aide des antigènes spécifiques de Leishmania conformes à l'invention, en mettant en incubation ledit sérum avec lesdits antigènes auxquels se lient les anticorps du groupe Leishmania, si de tels anticorps sont présents dans l'échantillon de sérum à contrôler, quelle que soit la souche infectante de Leishmania à pathogénie viscérale.

Selon un mode de mise en oeuvre avantageux du procédé de diagnostic de leishmaniose viscérale conforme à l'invention, une quantité appropriée d'un conjugué (anticorps anti-IgG ou anti-IgGAM (ou anti-IgG, anti-IgA, anti-IgM) marqués avec une enzyme, notamment la peroxydase), est mise en contact avec les éventuels complexes antigènes-anticorps préalablement formés pour provoquer la fixation des anti-IgG ou des anti-IgGAM (ou anti-IgG, anti-IgA, anti-IgM) sur lesdits anticorps liés, cette seconde étape du procédé de diagnostic étant suivie d'une troisième étape qui consiste à révéler lesdits complexes antigènes-anticorps préalablement formés à l'aide d'un substrat approprié, notamment de la diaminobenzidine additionnée d'eau oxygénée dans un tampon Tris, pour provoquer, en présence d'anticorps anti-Leishmania, l'apparition d'une couleur résultant de la réaction de l'enzyme du conjugué avec le substrat susdit, ladite réaction étant arrêtée par des moyens appropriés.

Selon un autre mode de mise en oeuvre avantageux du procédé de diagnostic de leishmaniose viscérale conforme à l'invention, un test ELISA ou un test RIA est mis en oeuvre.

La présente invention a également pour objet un procédé de production d'anticorps anti-antigènes des Leishmania qui provoquent la leishmaniose viscérale chez les mammifères, caractérisé en ce que :

- 10 -

- l'on immunise un animal approprié par injection d'antigènes de Leishmania conformes à l'invention ;
- l'on purifie les anticorps produits par ledit animal sur du Sépharose.

5            Selon un mode de mise en oeuvre avantageux du procédé de production d'anticorps anti-antigènes de Leishmania, lesdits anticorps produits sont des anticorps monoclonaux.

             Selon une autre disposition avantageuse du procédé de production d'anticorps anti-antigènes de Leishmania, les-  
10        dits anticorps produits sont des anticorps polyclonaux.

             La présente invention a en outre pour objet un kit, ou coffret, ou ensemble coordonné, prêt à l'emploi pour la mise en oeuvre du procédé de diagnostic de leishmanioses viscérales conforme à la présente invention, qui est caractérisé  
15        en ce qu'il comprend dans une première réalisation :

- une série de bandelettes présentant le profil antigénique de Leishmania infantum non révélé contenues dans un incubateur à rigoles multiples, chaque rigole étant recouverte d'un papier d'aluminium thermoscellé, permettant l'utilisation de chaque bandelette indépendamment ;
- un profil antigénique coloré à l'encre de Chine, permettant de déterminer la migration des antigènes indispensables au diagnostic ;
- une bandelette de contrôle présentant un profil antigénique de Leishmania ayant déjà réagi avec un sérum humain positif ;
- et/ou une bandelette de contrôle présentant un profil antigénique de Leishmania ayant déjà réagi avec un sérum canin positif ;
- 30        - une quantité appropriée de conjugué pour diagnostic humain d'anticorps anti-IgG ou anti-IgGAM ou anti-IgG, anti-IgA, anti-IgM marqués avec l'enzyme appropriée, dans un récipient convenable ;
- et/ou une quantité appropriée de conjugué pour diagnostic  
35        canin d'anticorps anti-IgG ou anti-IgGAM ou anti-IgG, anti-

- 11 -

- IgA, anti-IgM marqués avec l'enzyme appropriée, dans un récipient convenable ;
- une quantité appropriée de substrat approprié, notamment de diaminobenzidine dans un récipient convenable, additionnée
  - 5 d'une quantité appropriée de peroxyde d'hydrogène dans un récipient convenable ;
  - une solution de saturation PBS-Tween 20 à 0,3 % - lait écrémé à 5 %, dans un récipient convenable,
  - ou
  - 10 - une solution de saturation PBS-Tween 20 à 0,3 % - BSA à 1 %, dans un récipient convenable ;
  - une solution de tampon PBS-Tween 20 à 0,3 % ;
  - une solution de tampon PBS-Tween 20 à 0,1 % ;
  - une solution de tampon Tris 0,01 M pH 7,2.
- 15 Selon un autre mode de réalisation dudit kit, ou coffret, ou ensemble coordonné, prêt à l'emploi, ledit kit est caractérisé en ce qu'il comprend :
- des antigènes de *Leishmania infantum* dans des récipients séparés et présentés sous forme lyophilisée et conservés
  - 20 dans des récipients convenables ou adsorbés, en présence d'un agent conservateur tel que l'azidure de sodium à 0,1 % ou le merthiolate à 0,1 %, sur des supports solides adéquats ;
  - une quantité appropriée de sérum humain positif de contrôle,
  - 25 le, contenue dans un récipient convenable ;
  - et/ou une quantité appropriée de sérum canin positif de contrôle, contenue dans un récipient convenable ;
  - une quantité appropriée de conjugué pour diagnostic humain d'anticorps anti-IgG ou anti-IgGAM marqués avec une enzyme
  - 30 appropriée, dans un récipient convenable ;
  - et/ou une quantité appropriée de conjugué pour diagnostic canin d'anticorps anti-IgG ou anti-IgGAM marqués avec une enzyme appropriée, dans un récipient convenable ;
  - une quantité appropriée de substrat approprié, notamment de
  - 35 la diaminobenzidine pour la peroxydase, dans un récipient convenable additionnée d'une quantité appropriée de per-

- 12 -

- oxyde d'hydrogène dans un récipient convenable ;
- une solution de tampon PBS-Tween 20 à 0,3 % dans un récipient convenable ;
  - une solution de tampon PBS-Tween 20 à 0,01 % ;
  - 5 - une solution de tampon Tris 0,01 M pH 7,2 ;
  - une pluralité de plaques de microtitration utiles pour la réalisation du test ELISA.

Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions, qui ressortiront de la  
10 description qui va suivre.

L'invention sera mieux comprise à l'aide du complément de description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de préparation de profils antigéniques de Leishmania, et à des exemples de préparation d'antigènes spécifiques de  
15 Leishmania conformes à l'invention, à des exemples de mise en oeuvre des tests de détection des anticorps anti-Leishmania dans un échantillon de sérum à contrôler, par la technique d'analyse par immunoempreinte, des résultats d'une série de sérodiagnostics de leishmaniose viscérale humaine, des résultats d'une série de sérodiagnostics de leishmaniose viscérale  
20 canine effectués à l'aide de la technique d'analyse par immunoempreinte.

Il doit être bien entendu, toutefois, que ces exemples et les parties descriptives correspondantes, sont donnés  
25 uniquement à titre d'illustration de l'objet de l'invention, dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

#### **I - EXEMPLES DE PREPARATION DES PROFILS ANTIGENIQUES ET ANTIGENES SPECIFIQUES DE LEISHMANIA CONFORMES A L'INVENTION.**

##### **Exemple 1 - Préparation des profils antigéniques spécifiques 30 de Leishmania à partir de Leishmania infantum**

1.a. On cultive une souche LEM497 de Leishmania infantum à 28°C dans un milieu RPMI/199 (1:1) à 10 % de SVF pendant trois jours.

La virulence des souches est testée sur souris Balb/c au  
35 bout de cinq passage en culture hebdomadaires consécu-

- 13 -

tifs.

- 1.b. On centrifuge les *Leishmania* obtenues, le culot de centrifugation étant lavé 2 à 3 fois avec un tampon PBS stérile, on effectue alors une numération des *Leishmania* puis le culot est remis en suspension dans un tampon Tris- $\beta$ -mercaptoéthanol-SDS, la suspension obtenue étant mise dans un volume de telle sorte que ce volume contienne  $6.10^8$  *Leishmania*.
- 2.a. On réalise une électrophorèse selon la technique de LAEMMLI au moyen de gels de polyacrylamide à 10 % sur lesquels on dépose ledit volume contenant  $6.10^8$  *Leishmania*, afin de séparer les antigènes présents et de réaliser ainsi un profil électrophorétique antigénique.
- b. Les antigènes ainsi séparés sont transférés sur une feuille de nitrocellulose, selon la méthode de TOWBIN, sous l'action d'un champ électrique, à température ambiante, la différence de potentiel étant de 6 volts/cm de distance entre les électrodes, dans un tampon Tris/glycine/méthanol.
- c. Le profil antigénique ainsi transféré est alors conservé à sec et utilisé sous forme de bandelettes au fur et à mesure des besoins ; lesdites bandelettes présentent les profils antigéniques de *Leishmania* conformes à l'invention. Une partie de ces bandelettes est colorée, notamment à l'encre de Chine, ce qui permet de visualiser le profil antigénique présent sur la feuille de nitrocellulose.

**Exemple 2 - Préparation des antigènes spécifiques de *Leishmania* à partir de *Leishmania infantum***

- 1.a. On cultive les *Leishmania* comme décrit dans l'Exemple 1 ci-dessus.
- 1.b. On centrifuge les *Leishmania* comme décrit dans l'Exemple 1 ci-dessus.
- La suspension obtenue est mise dans un volume de telle sorte que ce volume contienne  $12.10^8$  à  $18.10^8$  *Leish-*

- 14 -

mania.

- 2.a. On réalise une électrophorèse sur gel de polyacrylamide.
- b. On découpe le gel en deux parties inégales ; une première partie est colorée et permet de déterminer la migration des antigènes spécifiques de Leishmania ; une deuxième partie est découpée en fonction de la migration desdits antigènes.
- 5
- c. Ladite deuxième partie du gel est alors réduite en purée, desséchée pour en réduire la masse puis remise en suspension dans 1 à 2 ml d'eau et injectée à un lapin en sous-cutanée dorsale.
- 10
- 3.a. On fait trois injections répétées à quatre semaines d'intervalle.
- b. Le lapin est saigné et on recueille 30 à 40 ml de sang à partir duquel le sérum est récupéré.
- 15
- c. La réactivité dudit sérum de lapin est testée.
- 4.a. Le sérum de lapin est utilisé pour faire une colonne d'affinité ; on purifie d'abord les anticorps sur une colonne de chromatographie appropriée, puis on les couple à du Sépharose à l'aide d'un agent de couplage approprié (bromure de cyanogène notamment), pour former un gel d'affinité.
- 20
- La purification peut être réalisée soit sur une colonne de protéine A-Sépharose (Pharmacia), soit sur une colonne d'échangeurs d'ions (DEAE-cellulose Pharmacia).
- 25
- Le couplage est réalisé soit à du Sépharose Cl6D, soit à du Sépharose Cl4B Pharmacia.
- On lave plusieurs fois la colonne avec du PBS-Tween 20 à 0,1 %.
- 30
- c. On prépare les antigènes à passer sur la colonne comme suit :
- Le culot de Leishmania obtenu dans les conditions de l'Exemple 1 est soniqué en présence de Tween 20 à 0,1 %.
- d. Une quantité appropriée du mélange d'antigènes ainsi obtenu est passée sur la colonne d'affinité, la quantité
- 35



- 15 -

introduite étant fonction de la capacité de rétention de la colonne. La colonne retient les antigènes spécifiques de Leishmania.

e. On lave avec du PBS-Tween 20 à 0,1 %.

5 5.a. Les antigènes sont ensuite élués de la colonne en présence d'une force ionique importante (1 M en NaCl) et recueillis.

b. Lesdits antigènes recueillis sont dialysés puis lyophilisés et conservés dans des récipients convenables ou  
10 adsorbés, en présence d'un agent conservateur tel que l'azidure de sodium à 0,1 % ou le merthiolate à 0,1 %, sur des supports solides.

## II - DETECTION DES ANTICORPS ANTI-LEISHMANIA PAR LA TECHNIQUE D'ANALYSE PAR IMMUNOEMPREINTE

15 Exemple α - Détection de la présence d'anticorps anti-Leishmania chez l'homme par la technique d'immunoempreinte

Le test de diagnostic de leishmaniose qui fait l'objet de la présente invention est un test simple, sensible et  
20 spécifique de la leishmaniose viscérale, tant chez l'homme que chez l'animal, notamment le chien, qui permet de détecter les anticorps anti-Leishmania à l'aide de bandelettes présentant des profils antigéniques spécifiques de Leishmania, qui réagissent avec le sérum de malade, quel que soit le sérotype  
25 infectant, tout en ne présentant pas de réactions croisées.

A. Ce test de diagnostic repose sur les principes suivants :

Le sérum à contrôler est mis en incubation dans un incubateur contenant des rigoles servant à accueillir les bandelettes présentant les profils antigéniques conformes  
30 à l'invention.

Si des anticorps anti-Leishmania sont présents dans l'échantillon humain, ils se lient auxdits antigènes.

La spécificité du test est liée aux reconnaissances suivantes :

35 Chez l'homme, le sérum doit reconnaître les trois antigènes

- 16 -

nes suivants : 150 KD, 94 KD et 75 KD, simultanément ou pas.

Le Tableau I représente la fréquence de reconnaissance des antigènes 150 KD, 94 KD et 75 KD chez l'homme.

5

TABLEAU I

10

Immuno- empreintes (numéro de bandelettes	Antigène 150 KD (nombre)	Antigène 94 KD (nombre)	Antigène 75 KD (nombre)	Antigène 150KD et/ou 94 KD et/ou 75 KD (nombre)
N°1-22 *	22/22	20/22	21/22	22/22
N°23-30**	0/8	0/8	0/8	0/8

15 \* : Malades

\*\* : Contrôles

Les sérums en provenance de sujets atteints de leishmanioses viscérales (bandelettes Nos. 1 à 22) reconnaissent les antigènes 150 KD, 94 KD et 75 KD avec une fréquence élevée, comme représenté sur le Tableau I.

20

Par contre le sérum négatif (bandelette n° 23), les sérums en provenance de sujets atteints de toxoplasmose (bandelette n° 24), les sérums en provenance de sujets atteints de leishmaniose cutanée (bandelettes Nos. 25-27), les sérums en provenance de sujets atteints de maladie de Chagas (bande-

25

lette n° 28) ou de maladie du sommeil (bandelettes Nos. 29-30) ne reconnaissent pas les trois antigènes spécifiques.

La figure 1 représente un profil antigénique en présence de marqueurs de masse moléculaire et permet de déterminer l'emplacement des antigènes 150 KD, 94 KD et 75 KD.

30

La figure 2, qui ne peut être lue qu'en regard de la figure 1, représente les immunoempreintes de reconnaissance des antigènes par des sérums humains, telles que définies dans le Tableau I. On voit que seuls les sujets atteints de leishmanioses viscérales reconnaissent avec une fréquence

35

telle que présentée dans le Tableau I, les trois antigènes.

- 17 -

Un conjugué tel qu'anticorps anti-IgG ou anti-IgGAM marqués avec une enzyme, notamment la peroxydase, est ajouté dans un deuxième temps et se fixe sur les fragments des anticorps retenus sur les bandelettes.

5. L'addition d'un substrat adapté selon l'enzyme, notamment peroxydase, dans un dernier stade est suivie de l'apparition d'une coloration plus ou moins intense sur la feuille de nitrocellulose, résultant de la réaction enzymatique si l'échantillon contient des anticorps anti-Leishmania. Au contraire, si l'échantillon testé ne contient pas d'anticorps anti-Leishmania, le conjugué n'est pas retenu et aucune coloration ne se développe sur la nitrocellulose.

#### REACTIFS

1. Bandelettes de nitrocellulose présentant des profils anti-géniques de Leishmania
  2. Sérum humain de contrôle négatif
  - 2' Sérum humain de contrôle positif provenant d'un malade connu pour être atteint de leishmaniose viscérale
  3. Conjugué anticorps - anti-IgG - peroxydase
  4. Substrat : diaminobenzidine
  5. Peroxyde d'hydrogène
  6. Tampons
    - 6.1. Tampon PBS-Tween 20 à 0,3 % avec 5 % lait écrémé
    - 6.2. Tampon PBS-Tween 20 à 0,3 % sans lait écrémé
    - 6.3. Tampon PBS-Tween 20 à 0,1 %
    - 6.4. Tampon Tris 0,01 M pH 7,2
- B. La technique mise en oeuvre est décrite ci-après :
- a) Les bandelettes présentant les profils antigéniques de Leishmania sont placées dans chacune des rigoles de l'incubateur ;
  - b) Lesdites bandelettes sont saturées avec le tampon PBS-Tween 20 à 0,3 % avec 5 % de lait écrémé pendant 45 minutes à température ambiante sous agitation ;

- 18 -

c) Après avoir retiré le lait des rigoles par retournement ou aspiration, on effectue le lavage des bandelettes contenues dans les rigoles.

5 A l'aide d'une pissette contenant du tampon PBS-Tween 20 à 0,3 %, on remplit chaque rigole avec 1 ml dudit tampon ; on laisse en contact 5 minutes et on vidange par retournement ou aspiration ; on répète 5 fois cette opération. Puis on effectue un dernier lavage en remplissant chaque rigole avec 1 ml de tampon PBS-Tween 20  
10 à 0,1 % ; on laisse en contact 5 minutes et on vidange par retournement ou aspiration ;

d1) On distribue 1 ml par rigole de sérum à tester humain dilué au 1/200 dans du PBS-Tween 20 à 0,1 %, deux cuves étant prévues pour les bandelettes de contrôle avec sé-  
15 rum humain positif et sérum humain négatif ;

d2) On incube une heure à température ambiante sous agitation ;

e) On vide les rigoles par retournement ou aspiration et on lave 6 fois 5 minutes avec du PBS-Tween 20 à 0,1 % ;

20 f) Addition du conjugué à la peroxydase.

La dilution dépend du lot et de la marque employée.

En général, les réactifs "Nordic"

- Homme : chèvre anti-IgG (H+L) humaine  
permettent de travailler à la dilution 1/5000.

25 On distribue 1 ml de la réaction finale du réactif dans PBS-Tween 20 à 0,1 %;

On incube 30 minutes à 37°C, à l'abri de la lumière.

g) On vide les rigoles par retournement ou aspiration et on lave 6 fois 5 minutes avec du PBS-Tween 20 à 0,1 % ;

30 h) On distribue 1 ml de la solution de substrat préparée selon un protocole approprié et on laisse incuber de 30 secondes à une heure à 37°C.

On arrête la réaction par addition d'eau distillée.

35 Remarque : Parfois, la réaction peut être extrêmement rapide, dans le cas de certains sérums positifs. Il

- 19 -

faut surveiller attentivement les empreintes, pour éviter tout bruit de fond.

i) On laisse sécher les bandelettes dans l'incubateur puis on les stocke.

5 On considère comme positif, c'est-à-dire contenant des anticorps anti-Leishmania, tout sérum, tant humain que canin, ayant conduit à l'observation d'une coloration de la bandelette.

**Exemple B - Détection de la présence d'anticorps anti-Leishmania chez le chien par la technique d'immunoempreinte chez le chien.**

A. Ce test de diagnostic repose sur les mêmes principes que ceux précisés dans l'Exemple A.

15 La spécificité du test est liée aux reconnaissances suivantes :

Chez le chien, le sérum doit reconnaître les trois antigènes suivants : 75 KD, 33 KD et 20 KD séparément, par paire ou simultanément.

20 Le Tableau II représente la fréquence de reconnaissance desdits trois antigènes chez le chien.

TABLEAU II

25	Immuno- empreintes (numéro de bandelettes)	Antigène 75 KD (nombre)	Antigène 33 KD (nombre)	Antigène 20 KD (nombre)	Antigène 75 KD et/ou 33 KD et/ou 20 KD (nombre)
	92 *	66/92	77/92	84/92	92/22
30	27 **	0/27	0/27	0/27	0/27

\* : Chiens malades

\*\* : Contrôles

C'est ainsi que l'on peut constater que les sérums positifs de chien reconnaissent les bandes 75 KD, 33 KD et 20 KD selon les fréquences précisées dans le Tableau II.

35 Les figures 3a, 3b, 3c et 3d représentent les immu-

- 20 -

noempreintes de reconnaissance des antigènes par des sérums canins positifs tels que définis dans le Tableau II.

Un conjugué de type lapin anti-IgG (H+L) de chien est utilisé.

- 5           Un substrat de même type que celui décrit dans l'Exemple  $\alpha$  est utilisé.

Si l'échantillon testé contient des anticorps, une coloration plus ou moins intense apparaît sur la feuille de nitrocellulose selon le même mécanisme que celui décrit dans  
10 l'Exemple  $\alpha$ .

#### REACTIFS

1. Bandelettes de nitrocellulose présentant ds profils anti-géniques de Leishmania
2. Sérum canin de contrôle négatif
- 15 3. Sérum canin de contrôle positif

Les sérums canins sont conservés sous glycérol à 50 % et à - 20°C.

Le substrat et les tampons sont tels que définis dans l'Exemple  $\alpha$ .

- 20 B. La technique mise en oeuvre est identique à celle de l'Exemple  $\alpha$ .

#### III - RESULTATS DE SERODIAGNOSTICS DE LEISHMANIOSES VISCERALES

- 25           **EXEMPLE A - Mise en évidence de la spécificité de la technique d'immunoempreinte (comparaison avec d'autres malades) chez l'homme.**

Le Tableau I et la figure 2 montrent la fréquence de reconnaissance des antigènes en fonction de l'origine du sérum utilisé.

- 30           Les sérums venant de leishmaniose viscérale reconnaissent spécifiquement un antigène de masse moléculaire de l'ordre de 150 KD, 20/22 reconnaissent un antigène de masse moléculaire de 94 KD et 21/22 un antigène de masse moléculaire de 75 KD et 22/22 reconnaissent un antigène de 150 KD et/  
35 ou un antigène de 94 KD et/ou un antigène de 75 KD.

- 21 -

La reconnaissance de ces trois antigènes, simultanément ou pas, permet d'établir un diagnostic sûr et spécifique de leishmaniose viscérale avec cette technique d'immunoempreinte. L'étude des contrôles de spécificité (malades à 5 parasitoses différentes) montre que ces antigènes ne sont pas reconnus par les anticorps présents dans les sérums de malades à parasitoses différentes.

**EXEMPLE B - Mise en évidence de la spécificité de la technique d'immunoempreinte chez le chien.**

10 Le Tableau II et les figures 3a, 3b, 3c et 3d montrent la fréquence de reconnaissance des antigènes en fonction de l'origine du sérum utilisé.

66/92 sérums canins venant de leishmaniose reconnaissent spécifiquement un antigène de masse moléculaire de 15 75 KD, 77/92 reconnaissent un antigène de 33 KD et 84/92 reconnaissent un antigène de 20 KD et 92/92 reconnaissent un antigène de 75 KD et/ou un antigène de 33 KD et/ou un antigène de 20 KD.

Par conséquent, la reconnaissance de ces trois 20 gènes, séparément, par paire ou simultanément, permet d'établir un diagnostic sûr et spécifique de leishmaniose, chez le chien, avec cette technique d'immunoempreinte.

**EXEMPLE C - Réactions croisées.**

Il faut noter que d'autres antigènes semblent 25 ment reconnus par les sérums de malades.

Des antigènes de *Leishmania infantum* semblent aussi reconnus par les sérums de malades présentant d'autres parasitoses notamment à flagellés ; ainsi des antigènes 70 KD et la région 55-60 KD sont reconnus, tant par des sérums de 30 lades atteints de leishmaniose viscérale que par des sérums de malades atteints d'autres affections à flagellés, telles que la maladie de Chagas, la trypanosomiase africaine, et même par des malades atteints de leishmaniose cutanée du Nouveau Monde.

35 Ces réactions croisées peuvent traduire une parenté

- 22 -

antigénique entre les différents trypanosomidés étudiés.

Des parentés antigéniques ont déjà été observées par CAMARGO et Al. entre certains antigènes de flagellés.

Toutefois, comme le montrent les figures 2, 3a, 3b  
5 3c et 3d, les antigènes selon l'invention sont spécifiques des leishmanioses viscérales et ne présentent pas de réactions croisées.

Le profil général en immunoempreintes obtenu avec des IgG montre qu'une immunité humorale spécifique est diri-  
10 gée contre quelques antigènes de *Leishmania infantum*.

Il résulte des données qui précèdent que l'on obtient avec les profils antigéniques conformes à l'invention dans la technique d'analyse par immunoempreinte et avec les antigènes purs conformes à l'invention avec le test ELISA des  
15 résultats spécifiques et précocément positifs, dans des cas de leishmanioses productrices d'anticorps, tant chez l'homme que chez l'animal, notamment le chien, ce qui permet de détecter précocement l'infection leishmanique, et par conséquent permet un traitement rapide du sujet malade.



- 23 -

REVENDICATIONS

- 1°) Antigènes spécifiques de Leishmania, parasite qui provoque la leishmaniose viscérale chez les mammifères, notamment chez l'homme et/ou chez le chien, caractérisés en ce qu'ils sont reconnus de manière spécifique par des sérums de malades d'origine humaine ou animale, notamment canine, atteints de leishmaniose viscérale et en ce qu'ils ne présentent pas de réactions croisées avec des sérums de malades atteints d'autres affections.
- 2°) Antigènes selon la revendication 1, caractérisés en ce qu'ils sont des antigènes de Leishmania infantum.
- 3°) Antigènes selon la revendication 1, caractérisés en ce qu'ils sont des antigènes de Leishmania donovani.
- 4°) Antigènes selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisés en ce qu'ils ont respectivement une masse moléculaire de 150 KD, une masse moléculaire de 94 KD, une masse moléculaire de 75 KD, une masse moléculaire de 30 KD, une masse moléculaire de 33 KD et une masse moléculaire de 20 KD.
- 5°) Antigènes selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisés en ce que lorsqu'ils ont une masse moléculaire de 150 KD, de 94 KD ou de 75 KD, ils sont reconnus par des IgG de sérums de malades d'origine humaine.
- 6°) Antigènes selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisés en ce que lorsqu'ils ont une masse moléculaire de 75 KD, de 33 KD ou de 20 KD, ils sont reconnus par des IgG de sérums de malades d'origine canine.
- 7°) Antigènes selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisés en ce que lorsqu'ils ont une masse moléculaire de 30 KD, ils sont reconnus par des IgE de sérums de malades d'origine humaine.
- 8°) Antigènes selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisés en ce que lesdits antigènes se trouvent chacun à l'état pur, sous forme liquide ou lyophilisée.

- 24 -

9°) Antigènes selon la revendication 8, caractérisés en ce qu'ils sont adsorbés sur des supports solides.

10°) Agent de diagnostic de la leishmaniose viscérale chez l'homme et chez l'animal, notamment le chien, caractérisé en ce qu'il est constitué par un profil électrophorétique, de préférence mis sous forme de bandelette, qui contient les antigènes selon l'une quelconque des revendications précédentes.

11°) Procédé de préparation des antigènes spécifiques de *Leishmania* selon les revendications 1 à 9, caractérisé en ce qu'il consiste :

- à cultiver des souches de *Leishmania*, parasite qui provoque la leishmaniose viscérale chez les mammifères, à une température et pendant une durée appropriée, dans un milieu approprié ;
- à séparer les antigènes obtenus, après centrifugation des dites cultures, dans le culot de centrifugation remis en suspension dans un tampon approprié, en réalisant une électrophorèse appropriée.

12°) Procédé selon la revendication 11, caractérisé en ce que les antigènes séparés par électrophorèse sont transférés par transfert ou électrotransfert sur des bandelettes en matériau approprié, pour former des profils antigéniques, dont une partie est éventuellement colorée à l'aide d'un colorant approprié, notamment de l'encre de Chine, lesdits profils antigéniques obtenus, portés par lesdites bandelettes, étant avantageusement conservés à sec.

13°) Procédé de préparation selon la revendication 11, caractérisé en ce que l'on cultive des souches de *Leishmania infantum* dans un milieu approprié, pendant environ 3 jours et à une température de 28°C pour obtenir un volume contenant  $4.10^7$  *Leishmania*/ml.

14°) Procédé selon la revendication 11 ou la revendication 13, caractérisé en ce que la souche de *Leishmania infantum* utilisée est une souche LEM497 (MCAN/GR/82).

- 25 -

15°) Procédé selon la revendication 11 ou la revendication 13, caractérisé en ce que la souche de *Leishmania infantum* utilisée est une souche LGR4 (HOM/GR/78/LGR4).

16°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 11 et 13 à 15, caractérisé en ce que le milieu de culture est un milieu RPMI/199 (1:1) à 10 % de SVF.

17°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 11 à 16, caractérisé en ce que l'électrophorèse est réalisée selon la technique de LAEMMLI avec des gels de polyacrylamide de concentration appropriée et sur lesquels sont déposées  $6.10^8$  *Leishmania* obtenues à partir du culot de centrifugation de culture remis en suspension dans un tampon approprié.

18°) Procédé selon la revendication 12, caractérisé en ce que le transfert ou l'électrotransfert des antigènes séparés par électrophorèse, selon la revendication 10, est réalisé à température ambiante sur nitrocellulose ou polyamide (nylon), pour former des profils antigéniques.

19°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 12 et 18, caractérisé en ce que les profils électrophorétiques antigéniques transférés non colorés constituent l'un des réactifs d'un coffret de diagnostic et les profils électrophorétiques transférés colorés, notamment à l'encre de Chine, constituent le profil antigénique total de *Leishmania*, les profils électrophorétiques tant colorés que non colorés étant découpés en bandelettes.

20°) Procédé selon la revendication 19, caractérisé en ce qu'une bandelette non colorée subit une incubation avec un sérum de malade ou de chien malade, en ce que le complexe antigène-anticorps formé est révélé par un conjugué enzymatique anti-homme ou anti-chien et en ce qu'on visualise sur la bandelette l'activité enzymatique.

21°) Procédé selon la revendication 19, caractérisé en ce qu'une bandelette colorée permet de révéler la plupart des antigènes présents, identifiés à l'aide de marqueurs de

- 26 -

masse moléculaire.

22°) Procédé selon la revendication 11, caractérisé en ce qu'on cultive des souches de *Leishmania donovani*.

23°) Procédé de préparation des antigènes spécifiques de *Leishmania* selon les revendications 1 à 9, caractérisé en ce qu'il consiste à :

- cultiver des souches de *Leishmania*, parasite qui provoque la leishmaniose viscérale chez les mammifères à une température et pendant une durée appropriées, dans un milieu approprié ;
- séparer les antigènes obtenus après centrifugation desdites cultures, dans le culot de centrifugation remis en suspension dans un tampon approprié en réalisant une électrophorèse appropriée ;
- injecter les antigènes ainsi séparés à un animal, notamment un lapin, pour provoquer la production chez ce dernier d'anticorps spécifiques contre lesdits antigènes ;
- séparer les anticorps produits par l'animal immunisé, notamment le lapin, du sérum prélevé chez ce dernier par chromatographie d'affinité ;
- isoler lesdits antigènes retenus sur la colonne d'affinité et les recueillir ensemble ou séparément sous forme liquide ou lyophilisée, lesdits antigènes étant éventuellement adsorbés sur un support solide approprié.

24°) Procédé de préparation selon la revendication 22, caractérisé en ce qu'on cultive des souches de *Leishmania infantum* dans un milieu RPMI/199 (1:1) à 10 % de SVF pendant environ 3 jours à une température de 28°C de manière à obtenir un volume contenant  $4.10^7$  *Leishmania*/ml.

25°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 23 et 24, caractérisé en ce que l'électrophorèse est réalisée sur des gels de polyacrylamide de concentration appropriée et sur lesquels sont déposés de  $12.10^8$  à  $18.10^8$  *Leishmania*.

26°) Procédé selon l'une quelconque des revendica-

- 27 -

tions 23 à 25, caractérisé en ce qu'une partie dudit gel est colorée au moyen d'un colorant, ladite coloration permettant de déterminer la migration des antigènes spécifiques de Leishmania dans ledit gel.

5           27°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 23 à 26, caractérisé en ce qu'une autre partie dudit gel est découpée en rapport avec lesdits antigènes spécifiques de Leishmania, mise sous une forme injectable et injectée à un animal, notamment un lapin, pour produire chez ce  
10   dernier des anticorps qui sont isolés du sérum prélevé chez ledit animal, lesdits anticorps étant purifiés sur une colonne de chromatographie appropriée puis couplés à du Sépharose à l'aide d'un agent de couplage approprié (bromure de cyano-gène notamment, pour former un gel d'affinité.

15           28°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 23 à 27, caractérisé en ce qu'on produit avec les anticorps couplés, une colonne d'affinité dans laquelle est passé un lysat de Leishmanies resuspendu dans un tampon approprié.

20           29°) Procédé selon les revendications 23 à 28, caractérisé en ce que les antigènes retenus par la colonne sont recueillis en présence d'une haute force ionique et constituent les antigènes spécifiques purs de Leishmania selon la revendication 8.

25           30°) Procédé de diagnostic de leishmaniose viscérale qui consiste à détecter les anticorps anti-Leishmania présents dans un sérum à contrôler, à l'aide des antigènes spécifiques de Leishmania selon les revendications 1 à 10, en mettant en incubation ledit sérum avec lesdits antigènes auxquels se lient les anticorps du groupe Leishmania, si de tels  
30   anticorps sont présents dans l'échantillon de sérum à contrôler, quelle que soit la souche infectante de Leishmania à pathogénie viscérale.

35           31°) Procédé de diagnostic selon la revendication 30, caractérisé en ce qu'une quantité appropriée d'un conjugué (anticorps anti-IgG ou anti-IgGAM ou anti-IgG, anti-IgA,

- 28 -

anti-IgM marqués avec une enzyme, notamment la peroxydase), est mise en contact avec les éventuels complexes antigènes-anticorps préalablement formés pour provoquer la fixation des anti-IgG ou des anti-IgGAM (ou anti-IgG, anti-IgA, anti-IgM) sur lesdits anticorps liés, cette seconde étape du procédé de diagnostic étant suivie d'une troisième étape qui consiste à révéler lesdits complexes antigènes-anticorps préalablement formés à l'aide d'un substrat approprié, notamment de la diaminobenzidine additionnée d'eau oxygénée dans un tampon Tris, pour provoquer, en présence d'anticorps anti-Leishmania, l'apparition d'une couleur résultant de la réaction de l'enzyme du conjugué avec le substrat susdit, ladite réaction étant arrêtée par des moyens appropriés.

32°) Procédé de diagnostic selon l'une quelconque des revendications 30 et 31, caractérisé en ce que la troisième étape du procédé est constituée par la mise en oeuvre du test ELISA ou d'un test RIA.

33°) Procédé de production d'anticorps anti-antigènes des Leishmania qui provoquent la leishmaniose viscérale chez les mammifères, caractérisé en ce que :

- l'on immunise un animal approprié par injection d'antigènes de Leishmania selon l'une quelconque des revendications 1 à 9 ;
- l'on purifie les anticorps produits par ledit animal sur du Sépharose.

34°) Procédé de production d'anticorps selon la revendication 33, caractérisé en ce que les anticorps produits sont des anticorps monoclonaux.

35°) Procédé de production d'anticorps selon la revendication 33, caractérisé en ce que les anticorps produits sont des anticorps polyclonaux.

36°) Kit, ou coffret, ou ensemble coordonné, prêt à l'emploi pour la mise en oeuvre du procédé de diagnostic de leishmanioses viscérales, caractérisé en ce qu'il comprend :  
- une série de bandelettes présentant le profil antigénique

- 29 -

de *Leishmania infantum* non révélé contenues dans un incubateur à rigoles multiples, chaque rigole étant recouverte d'un papier d'aluminium thermoscellé, permettant l'utilisation de chaque bandelette indépendamment ;

- 5 - un profil antigénique coloré à l'encre de Chine, permettant de déterminer la migration des antigènes indispensables au diagnostic ;
- une bandelette de contrôle présentant un profil antigénique de *Leishmania* ayant déjà réagi avec un sérum humain positif ;
- 10 - et/ou une bandelette de contrôle présentant un profil antigénique de *Leishmania* ayant déjà réagi avec un sérum canin positif ;
- une quantité appropriée de conjugué pour diagnostic humain d'anticorps anti-IgG ou anti-IgGAM ou anti-IgG, anti-IgA, anti-IgM marqués avec l'enzyme appropriée, dans un réci-
- 15 pient convenable ;
- et/ou une quantité appropriée de conjugué pour diagnostic canin d'anticorps anti-IgG ou anti-IgGAM ou anti-IgG, anti-
- 20 IgA, anti-IgM marqués avec l'enzyme appropriée, dans un réci-
- pient convenable ;
- une quantité appropriée de substrat approprié, notamment de diaminobenzidine pour la peroxydase dans un réci-
- 25 pient convenable, additionnée d'une quantité appropriée de peroxyde d'hydrogène dans un réci-
- pient convenable ;
- une solution de saturation PBS-Tween 20 à 0,3 % - lait écrémé à 5 %, dans un réci-
- pient convenable,
- ou
- une solution de saturation PBS-Tween 20 à 0,3 % - BSA à
- 30 1 %, dans un réci-
- pient convenable ;
- une solution de tampon PBS-Tween 20 à 0,3 % ;
- une solution de tampon PBS-Tween 20 à 0,1 % ;
- une solution de tampon Tris 0,01 M pH 7,2.

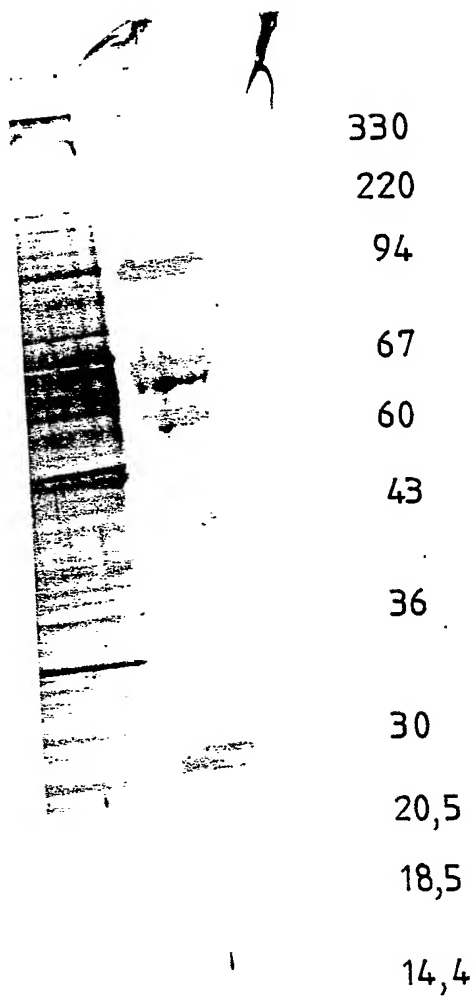
37°) Kit, ou coffret, ou ensemble coordonné, prêt à  
35 l'emploi, caractérisé en ce qu'il comprend :

- 30 -

- des antigènes de *Leishmania infantum* dans des récipients séparés et présentés sous forme lyophilisée et conservés dans des récipients convenables ou adsorbés, en présence d'un agent conservateur tel que l'azidure de sodium à 0,1 %  
5 ou le merthiolate à 0,1 %, sur des supports solides adéquats ;
- une quantité appropriée de sérum humain positif de contrôle, contenue dans un récipient convenable ;
- et/ou une quantité appropriée de sérum canin positif de  
10 contrôle, contenue dans un récipient convenable ;
- une quantité appropriée de conjugué pour diagnostic humain d'anticorps anti-IgG ou anti-IgGAM marqués avec une enzyme appropriée, dans un récipient convenable ;
- et/ou une quantité appropriée de conjugué pour diagnostic  
15 canin d'anticorps anti-IgG ou anti-IgGAM marqués avec une enzyme appropriée, dans un récipient convenable ;
- une quantité appropriée de substrat approprié, notamment de la diaminobenzidine pour la peroxydase dans un récipient convenable, additionnée d'une quantité appropriée de per-  
20 oxyde d'hydrogène dans un récipient convenable ;
- une solution de tampon PBS-Tween 20 à 0,3 % dans un récipient convenable ;
- une solution de tampon PBS-Tween 20 à 0,01 % ;
- une solution de tampon Tris 0,01 M pH 7,2 ;
- 25 - une pluralité de plaques de microtitration utiles pour la réalisation du test ELISA.



1 / 6

FIG.1

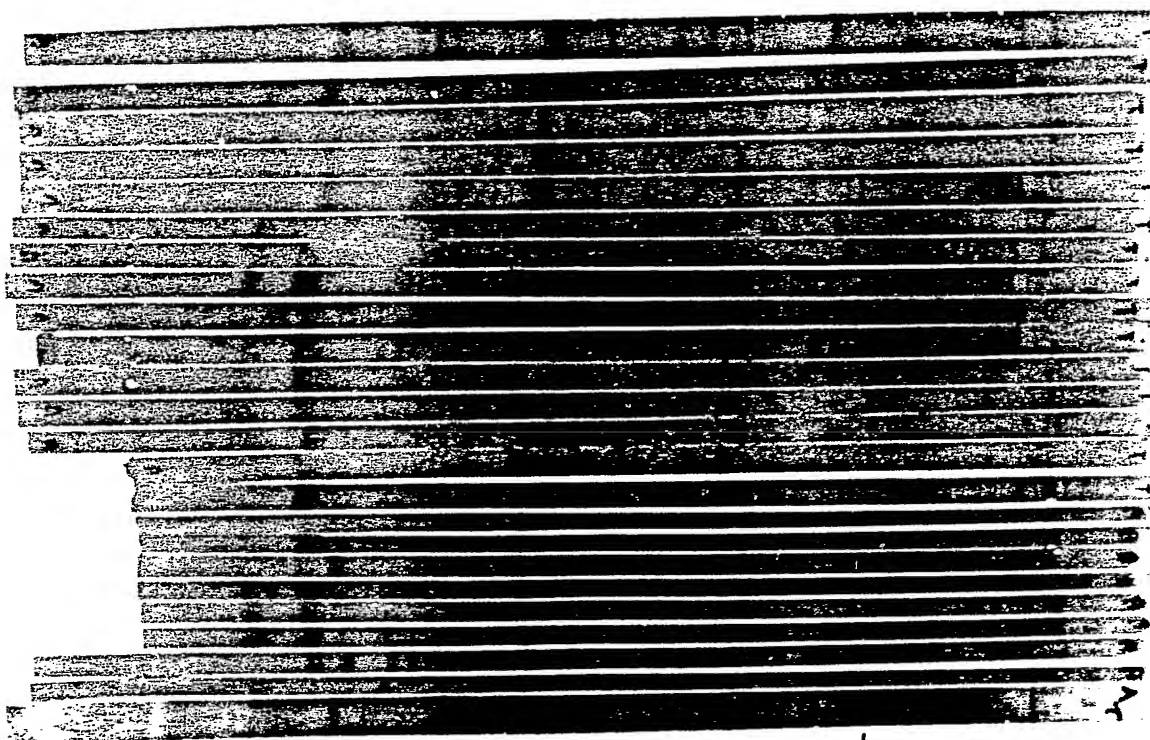
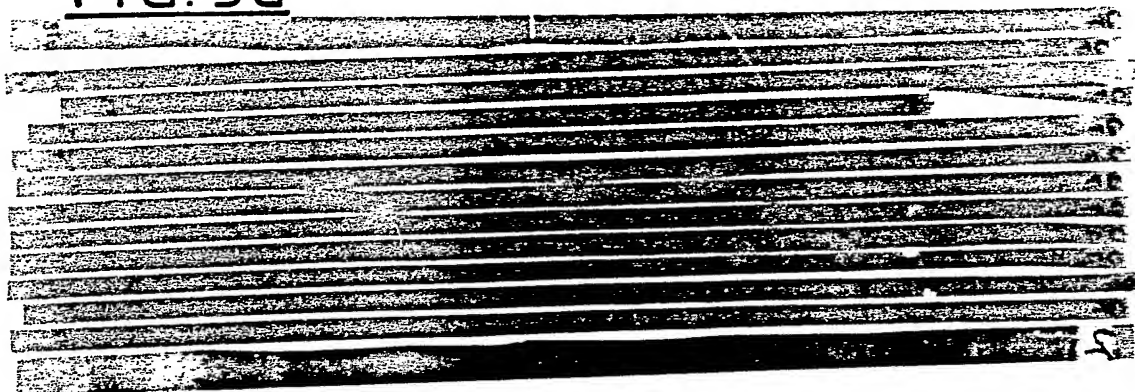
LEM 497

Serum H

FIG. 2

FIG. 3a

3 / 6



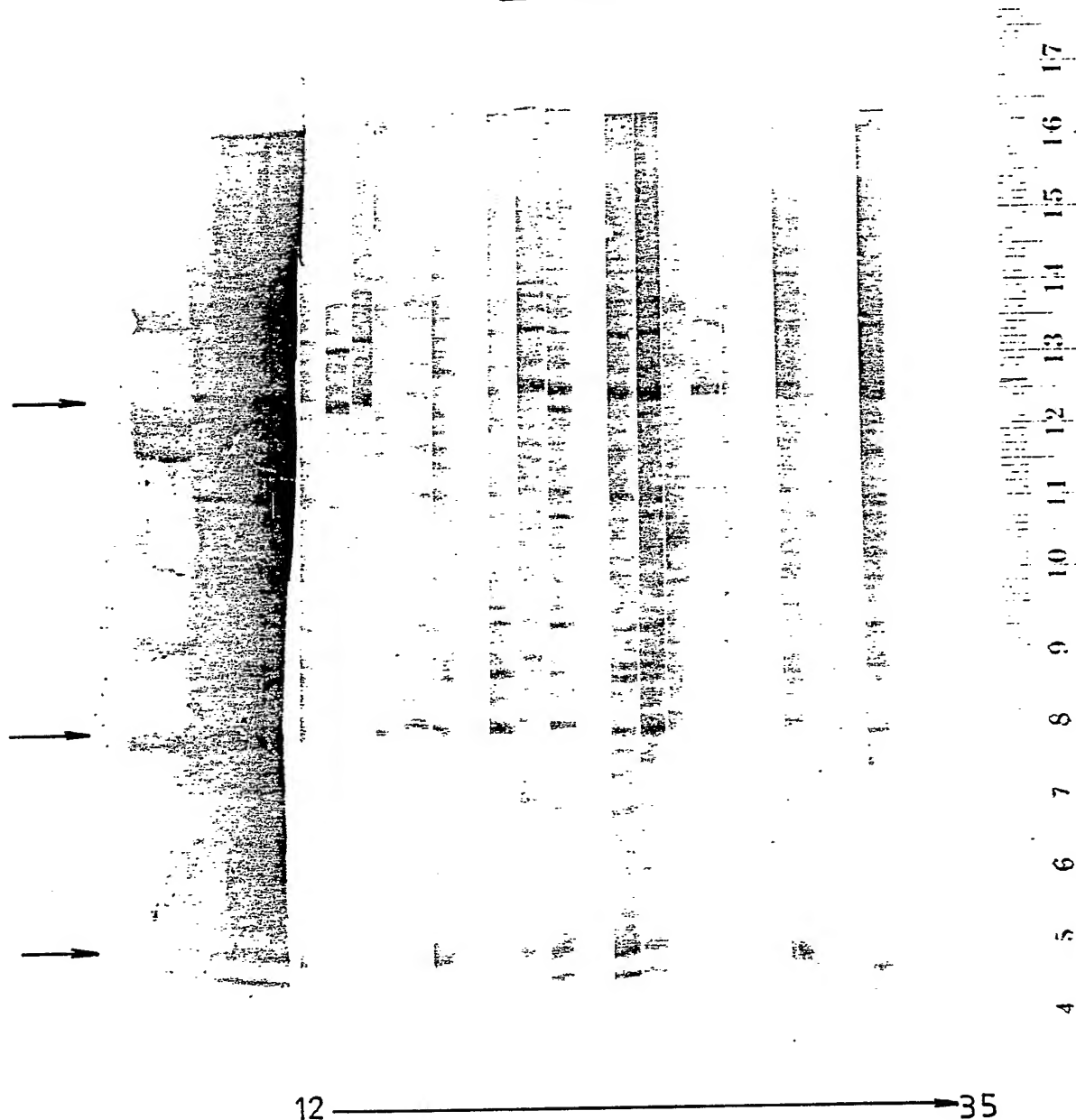
1  
1136  
43

2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20

20 75

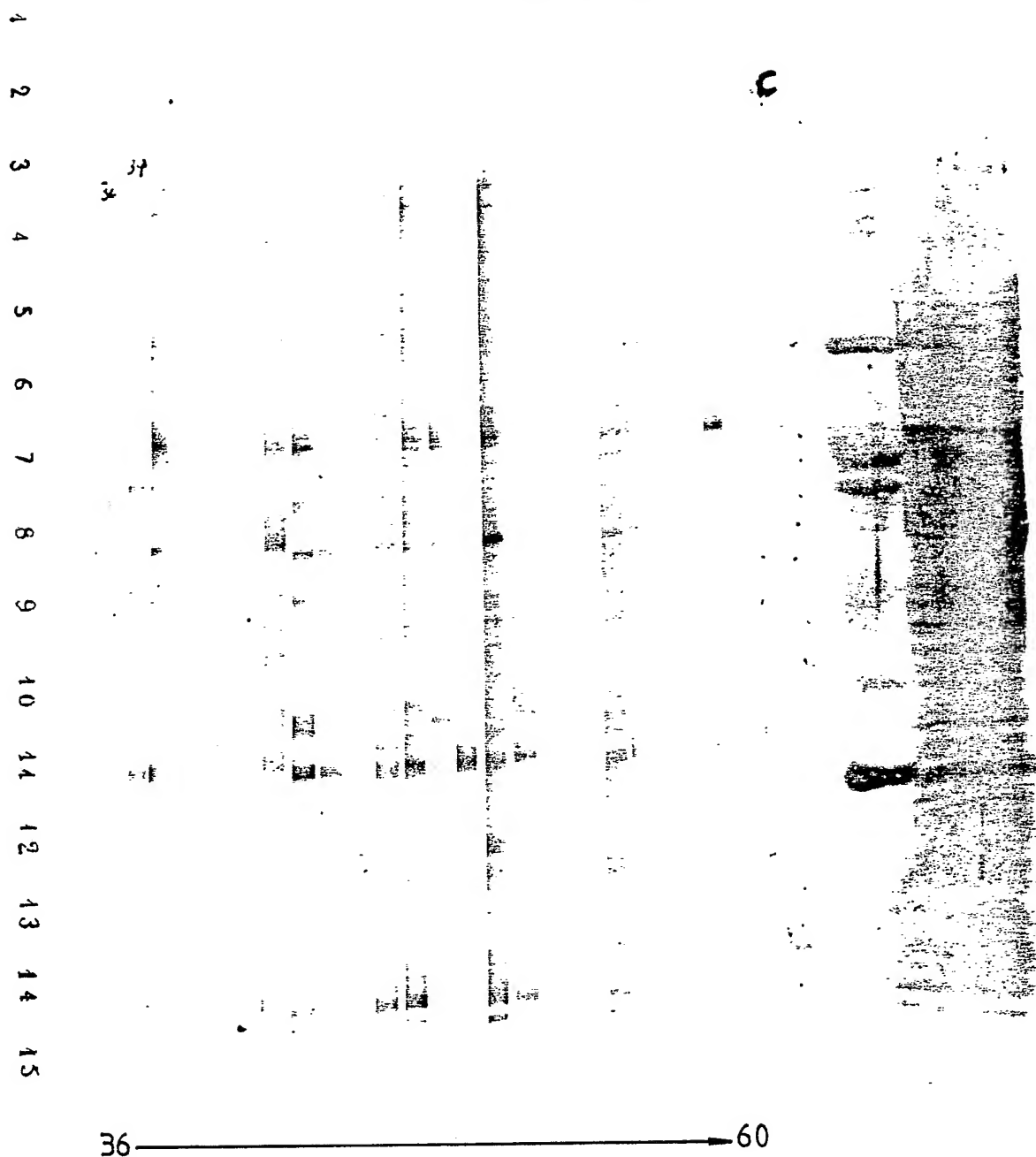
4 / 6

FIG. 3b



5 / 6

FIG. 3c



6 / 6

FIG. 3d

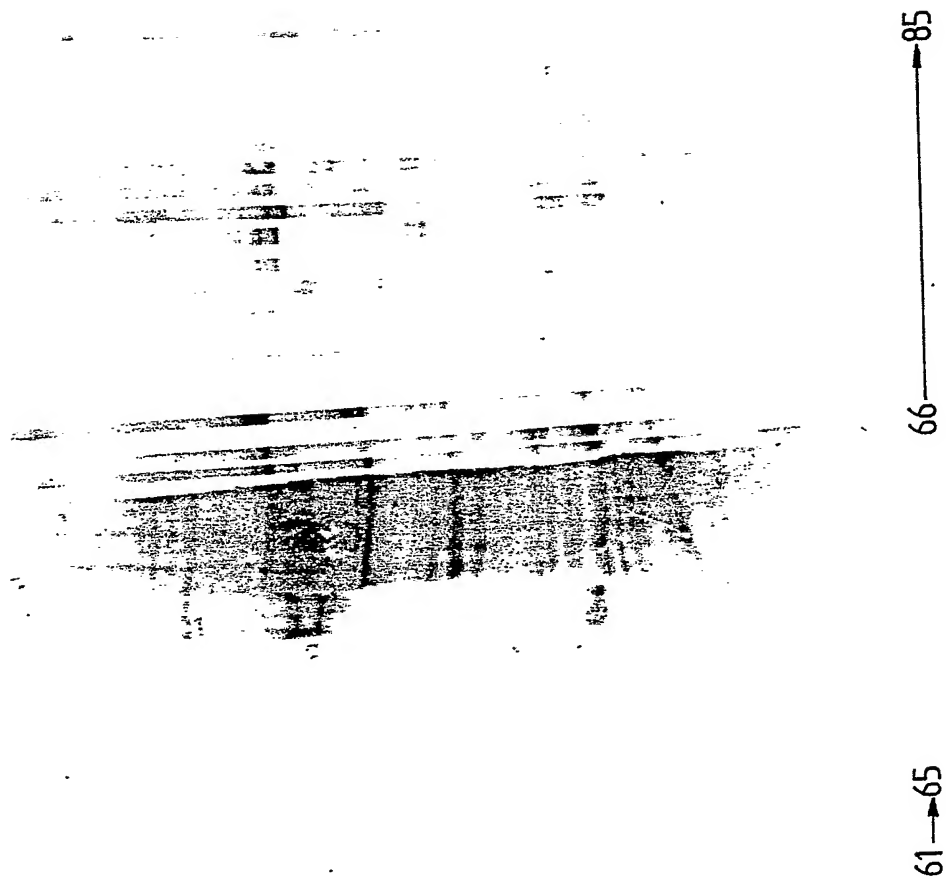


FIGURE 3d

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/FR 88/00400

<b>I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> (if several classification symbols apply, indicate all) <sup>6</sup>		
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC		
Int.Cl. <sup>4</sup> : C 12 P 21/00; G 01 N 33/569; //(C12 P 21/00; C 12 R 1:90)		
<b>II. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum Documentation Searched <sup>7</sup>		
Classification System	Classification Symbols	
Int.Cl. <sup>4</sup>	C 12 P; G 01 N; A 61 K	
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched <sup>8</sup>		
<b>III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b> <sup>9</sup>		
Category *	Citation of Document, <sup>11</sup> with indication, where appropriate, of the relevant passages <sup>12</sup>	Relevant to Claim No. <sup>13</sup>
X	WO, A, 86/02098 (INSTITUT PASTEUR) 10 April 1986, see the whole document --	1-7,30-35
Y	WO, A, 83/01785 (BRIGHAM & WOMEN'S HOSPITAL) 26 May 1983, see the whole document --	1-7
X	The Journal of Immunology, vol. 133, no. 1, July 1984 The American Association of Immunologists (US) C.L.Jaffe et al.: "Production and characterization of species-specific monoclonal antibodies against Leishmania donovani for immunodiagnosis" pages 440-447, see the whole document --	1-7,30-35
X	The Journal of Immunology, vol. 138, no. 5, 1 st March 1987 The American Association of Immunologists (US) S.G. Reed et al. : "Identification of specific and cross-reactive antigens of Leishmania donovani chagasi by human infection sera", pages 1596-1601	1-7,30-35
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>* Special categories of cited documents: <sup>10</sup></p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p> </div> </div>		
<b>IV. CERTIFICATION</b>		
Date of the Actual Completion of the International Search	Date of Mailing of this International Search Report	
14 November 1988 (14.11.1988)	02 December 1988 (02.12.1988)	
International Searching Authority	Signature of Authorized Officer	
EUROPEAN PATENT OFFICE		

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)		
Category *	Citation of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No
	see the whole document --	
X	Chemical Abstracts, vol. 104, no. 23, 9 June 1986 (Columbus, Ohio, US) H.W. Sheppard et al.: "Cloning of Leishmania donovani genes encoding antigens recognized during human visceral leishmaniasis", see page 229, abstract no. 201558c & Mol.Biochem. Parasitol. 1986, 19(1), 35-43 --	1-7
X	Biological Abstracts, vol. 81, no. 3, March 1986, abstract no. 24014 (Philadelphia, PA, US) T. Yi et al.: "Characterization of antigens recognized by monoclonal antibodies against promastigotes of Leishmania donovani Xinjias strain" & Acta Acad. Med. Sichuan 16(3): 177-180, 1985, see the whole abstract --	1-7
X	Biological Abstracts, vol. 81, no. 3, March 1986, abstract no. 23994 (Philadelphia, PA, US) J.-L. Lemesre et al.: "Subspecies- specific surface antigens of promastigotes of the Leishmania donovani complex" & Infect. Immun. 50(1): 136-141, 1985, see the whole abstract --	1-7
Y	Biological Abstracts, vol. 81, no. 11, December 1986, abstract no. 98081 (Philadelphia, PA, US) R. Badaro et al.: "Evaluation of the micro-ELISA for antibodies in American visceral leishmaniasis: Antigen selection for detection of infection- specific responses", & Am. J. Trop. Med. Hyg. 35(1): 72-78, 1986, see the whole abstract -----	1, 30-35



# ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.

FR 8800400

SA 23775

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on 23/11/88. The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A- 8602098	10-04-86	FR-A, B 2570947	04-04-86
		EP-A- 0197062	15-10-86
		OA-A- 8168	31-03-87
		FR-A, B 2577140	14-08-86
WO-A- 8301785	26-05-83	AU-A- 1044782	01-06-83
		EP-A- 0093774	16-11-83

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale N° PCT/FR 88/00400

<b>I. CLASSEMENT DE L'INVENTION</b> (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) <sup>7</sup>		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB CIB <sup>4</sup> : C 12 P 21/00; G 01 N 33/569; //(C 12 P 21/00; C 12 R 1:90)		
<b>II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTÉ</b>		
Documentation minimale consultée <sup>8</sup>		
Système de classification	Symboles de classification	
CIB <sup>4</sup>	C 12 P; G 01 N; A 61 K	
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté <sup>9</sup>		
<b>III. DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS</b> <sup>10</sup>		
Catégorie *	Identification des documents cités, <sup>11</sup> avec indication, si nécessaire, des passages pertinents <sup>12</sup>	N° des revendications visées <sup>13</sup>
X	WO, A, 86/02098 (INSTITUT PASTEUR) 10 avril 1986, voir le document en entier --	1-7,30-35
Y	WO, A, 83/01785 (BRIGHAM & WOMEN'S HOSPITAL) 26 mai 1983, voir le document en entier --	1-7
X	The Journal of Immunology, vol. 133, no. 1, juillet 1984 The American Association of Immunologists (US) C.L. Jaffe et al.: "Production and characterization of species-specific monoclonal antibodies against Leishmania donovani for immunodiagnosis" pages 440-447, voir le document en entier --	1-7,30-35
X	The Journal of Immunology, vol. 138, no. 5, 1er mars 1987 The American Association of Immunologists (US) S.G. Reed et al.: "Identification of specific and cross-reactive antigens of Leishmania donovani chagasi by human infection sera", pages 1596-1601	1-7,30-35
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>* Catégories spéciales de documents cités: <sup>11</sup></p> <p>« A » document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>« E » document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>« L » document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>« O » document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>« P » document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>« T » document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>« X » document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive</p> <p>« Y » document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier.</p> <p>« &amp; » document qui fait partie de la même famille de brevets</p> </div> </div>		
<b>IV. CERTIFICATION</b>		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée  <div style="text-align: center;">14 novembre 1988</div>	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale  <div style="text-align: center;">- 2 DEC 1988</div>	
Administration chargée de la recherche internationale  <div style="text-align: center;">OFFICE EUROPEEN DES BREVETS</div>	Signature du fonctionnaire autorisé  <div style="text-align: center;">   <b>P.C.G. VAN DER PUTTEN</b> </div>	

III. DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		
(SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDICUÉS SUR LA DEUXIÈME FEUILLE)		
Catégorie	Identification des documents cités, avec indication, si nécessaire, des passages pertinents	N° des revendications visées
	voir le document en entier --	
X	Chemical Abstracts, vol. 104, no. 23, - 9 juin 1986 (Columbus, Ohio, US) H.W. Sheppard et al.: "Cloning of Leishmania donovani genes encoding antigens recognized during human visceral leishmaniasis", voir page 229, abrégé no. 201558c & Mol. Biochem. Parasitol. 1986, 19(1), 35-43 --	1-7
X	Biological Abstracts, vol. 81, no. 3, mars 1986, abrégé no. 24014 (Philadelphia, PA, US) T. Yi et al.: "Characterization of antigens recognized by monoclonal antibodies against promastigotes of Leishmania donovani Xinjias strain" & Acta Acad. Med. Sichuan 16(3): 177-180, 1985, voir l'abrégé en entier --	1-7
X	Biological Abstracts, vol. 81, no. 3, mars 1986, abrégé no. 23994 (Philadelphia, PA, US) J.-L. Lemesre et al.: "Subspecies-specific surface antigens of promastigotes of the Leishmania donovani complex" & Infect. Immun. 50(1): 136-141, 1985, voir l'abrégé en entier --	1-7
Y	Biological Abstracts, vol. 81, no. 11, décembre 1986, abrégé no. 98081 (Philadelphia, PA, US) R. Badaro et al.: "Evaluation of the micro-ELISA for antibodies in American visceral leishmaniasis: Antigen selection for detection of infection-specific responses", & Am. J. Trop. Med. Hyg. 35(1): 72-78, 1986, voir l'abrégé en entier -----	1,30-35

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE  
RELATIF A LA DEMANDE INTERNATIONALE NO.**

FR 8800400  
SA 23775

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche international visé ci-dessus.  
Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 23/11/88  
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO-A- 8602098	10-04-86	FR-A, B 2570947	04-04-86
		EP-A- 0197062	15-10-86
		OA-A- 8168	31-03-87
		FR-A, B 2577140	14-08-86
-----			
WO-A- 8301785	26-05-83	AU-A- 1044782	01-06-83
		EP-A- 0093774	16-11-83
-----			